

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri pada Ikan Kembung (*Rastrelliger* sp.) Asin Berkitosan**Isolation and Characterization of Bacteria on Dried-Salted Mackerel (*Rastrelliger* sp.) with Chitosan Addition****Diana AGUSTINA¹, Cut YULVIZAR² dan Risa NURSANTY³**Email: Yunda_mnz@yahoo.com

^{1,2,3}, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Syiah Kuala
Darussalam - Banda Aceh (23111)

Abstract. Chitosan as antibacterial can be used to preserve fish. The research aims to isolate and characterize bacteria on dried-salted mackerel (*Rastrelliger* sp.) with addition of chitosan as an edible coating. We conducted the research from May to August 2012 at Laboratory of Microbiology Syiah Kuala University, Banda Aceh. Descriptive method were used in this research. The result showed that there were six isolates varied morphological colony and cell. The forms of colony and cell morphology were circular (50%), convex elevation (33,3%), entire margin (50%), yellow color (66,7%), gram positive (66,7%), cocci shape (100%), nonspore (66,7%) and motile (66,7%).

Keywords: Chitosan concentrations, *Rastrelliger* sp., isolate and characterize

Abstrak. Kitosan memiliki sifat antibakteri sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan pengawet ikan. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh dari bulan Mei sampai Agustus 2012, untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri pada ikan kembung (*Rastrelliger* sp.) asin berkitosan. Metode yang digunakan dalam penelitian ini deskriptif. Dari hasil isolasi didapat enam isolat yang memiliki morfologi koloni dan sel yang berbeda. Isolat yang memiliki bentuk bundar (50%), elevasi cembung (33,3%), tepian licin (50%) warna kuning (66,7%), sel bakteri gram positif (66,7%), bentuk sel bulat (100%), tidak berspora (66,7%) dan bersifat motil (66,7%).

Kata kunci : konsentrasi kitosan, *Rastrelliger* sp., isolasi dan karakterisasi

PENDAHULUAN

Perairan Indonesia memiliki potensi perikanan yang besar sekitar 7,6 juta ton/tahun. Ikan kembung (*Rastrelliger* sp.) merupakan salah satu ikan yang tersebar di seluruh laut Indonesia (Heruwati, 2002). Ikan ini umumnya banyak terdapat di perairan laut Jawa, Selat Malaka dan Selat Sunda (Wudianto *et al.*, 2004). Tubuh ikan mengandung 80% kadar air dan mempunyai pH > 5,3. Kondisi ini sangat baik untuk pertumbuhan bakteri pembusuk, untuk itu perlu dilakukan pengawetan pada ikan segar. Pengawetan tradisional yang sering dilakukan oleh masyarakat yaitu dengan cara

penggaraman dan pengeringan atau yang lebih dikenal dengan ikan asin (Afrianto dan Liviawaty, 1989).

Masyarakat sering menambahkan larutan formalin sebagai pengawet yang bertujuan agar memiliki daya simpan yang lebih lama dan tidak membuat ikan menjadi rusak. Pemakaian formalin tidak dianjurkan karena mengandung zat formaldehid yang bersifat racun bagi manusia (Purwani dan Muwakhidah, 2008). Salah satu pengganti pengawet kimia yang aman dan ramah lingkungan adalah kitosan.

Kitosan sebagai *edible coating* dapat berfungsi sebagai antimikroba yang digunakan pada pengawetan ikan. *Edible coating* merupakan bahan pelapis makanan yang dapat langsung dimakan. Lapisan *edible* yang terbentuk pada permukaan ternyata dapat memperpanjang masa simpan dengan cara menahan laju respirasi dan pertumbuhan mikroba (Suptijah *et al.*, 2008).

Penggunaan kitosan sebagai *edible coating* pada produk perikanan khususnya ikan asin masih sangat terbatas, berdasarkan hal tersebut penting dilakukan isolasi dan karakterisasi morfologi bakteri pada ikan kembung (*Rastrelliger* sp.) asin berkitosan.

METODOLOGI

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan kembung (*Rastrelliger* sp.) dengan ukuran rata-rata 18 cm, garam dapur, NaCl 10%, serbuk kitosan, larutan asam asetat (CH_3COOH) 2% (v/v), media *Nutrient Agar* (NA), media *Sulfid Indol Motility* (SIM), ungu kristal-iodium, alkohol 95%, safranin, lugol, *malachite green*, akuades, minyak emersi, kapas, aluminium foil dan plastik pembungkus.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, tabung reaksi, blender, erlenmeyer, *magnetic stirrer*, pinset, pipet tetes, gelas kimia, gelas ukur, kaca objek, kaca penutup, jarum inokulasi, bunsen, autoklaf, inkubator, *hot plate*, mortar porselen, mikroskop cahaya, timbangan digital, baskom plastik, jaring kawat, plastik mika bening, tampah dan kamera digital.

Sterilisasi alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini seperti, cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, gelas ukur, beserta media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri disterilisasi dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit (Hadioetomo, 1993).

Pengolahan ikan kembung (*Rastrelliger* sp.) asin

Proses pengolahan ikan kembung (*Rastrelliger* sp.) asin terlebih dahulu dengan memilih ikan kembung sebanyak 15 ekor dengan ukuran rata-rata 18 cm. Selanjutnya ikan dibersihkan dengan membuang isi perut dan usus ikan. Kemudian ikan dibelah menjadi dua bagian tanpa terputus selanjutnya dicuci sampai bersih. Ikan yang sudah bersih ditiriskan dalam keranjang dengan bagian dalam ikan menghadap ke bawah agar air tidak mengendap dan sampai tidak ada lagi air yang menetes. Selanjutnya proses penggaraman ikan dimulai dengan membuat garam 10%, dengan menimbang sebanyak 100 g garam dapur dan dilarutkan dalam air hingga mencapai volume 1 liter. Setelah terlarut sempurna, kotoran yang terdapat dalam larutan garam dibuang. Ikan dan larutan garam dicampur rata dalam ember sampai semua ikan terendam dalam larutan garam, selanjutnya ditutup dan ikan dibiarkan terendam dalam larutan garam kira-kira 8 jam. Setelah proses penggaraman selesai, ikan diletakkan di atas tampah dan ditutup dengan plastik agar tidak terkontaminasi dengan lingkungan luar dan bagian atas plastik dilubangi agar mengurangi proses penguapan. Selanjutnya ikan dijemur dibawah sinar matahari sampai setengah kering kira-kira 2 hari (Sedjati and Agustini, 2007).

Proses pencelupan ikan dalam larutan kitosan

Penelitian ini menggunakan ikan kembung (*Rastrelliger* sp.) asin berkitosan 1,5% dan 3% serta tanpa kitosan. Sebanyak 1,5 g dan 3 g serbuk kitosan dihaluskan menggunakan blender dan dicampur dengan 100 ml larutan asam asetat 2% kemudian diaduk sampai terlarut. Selanjutnya ikan yang sudah dijemur setengah kering dicelupkan ke dalam larutan kitosan 1,5% dan sebagian lagi dicelupkan pada konsentrasi 3% selama 1 menit kemudian ditiriskan. Ikan yang sudah dicelupkan larutan kitosan dijemur kembali dibawah sinar matahari kira-kira 8 jam.

Isolasi dan karakterisasi morfologi bakteri

Koloni-koloni bakteri yang terpisah dan tampak berbeda masing-masing diambil sebanyak satu jarum inokulasi dan dikulturkan ke media NA (yang telah ditambahkan NaCl sebanyak 10%) menggunakan metode cawan gores. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam (Savitri, 2006). Tahapan berikutnya adalah pengamatan terhadap morfologi koloni yang meliputi bentuk, warna, ukuran, tepian dan elevasi koloni. Pengamatan morfologi sel meliputi uji pewarnaan Gram, pewarnaan spora, bentuk sel dan uji pergerakan bakteri atau motilitas (Hadioetomo, 1993).

Pengamatan bentuk sel dilakukan bersamaan dengan hasil pewarnaan Gram. Tahapan pewarnaan Gram dilakukan sebagai berikut, sebanyak satu sampai dengan dua tetes akuades diteteskan pada kaca objek, selanjutnya diambil koloni tunggal dari masing-masing isolat bakteri menggunakan jarum inokulasi kemudian disebar secara merata. Olesan bakteri dibiarkan kering dan difiksasi. Selanjutnya olesan bakteri ditetesi dengan larutan ungu kristal-iodium selama satu menit dan dibilas dengan akuades. Olesan kemudian ditetesi larutan iodium selama dua menit serta dibilas kembali dengan akuades. Olesan selanjutnya ditetesi alkohol 95% selama 10 detik sampai zat warna tidak luntur lagi dan dibilas dengan akuades. Tahap akhir dari proses pewarnaan adalah dengan menambahkan pewarnaan pembanding yaitu safranin selama 10-15 detik dan dibilas dengan akuades. Selanjutnya ditetesi dengan minyak emersi, lalu dilihat bentuk dan warna sel bakteri di bawah mikroskop dengan pembesaran 40x10 (Hadioetomo, 1993).

Tahapan selanjutnya adalah pewarnaan spora. Sebanyak satu sampai dua tetes akuades diteteskan pada kaca objek, selanjutnya diambil koloni tunggal dari masing-masing isolat bakteri dengan menggunakan jarum inokulasi kemudian disebar secara merata. Olesan bakteri dibiarkan kering dan difiksasi. Selanjutnya ditetesi pewarna *malachite green* dan dibiarkan kering selama dua menit dengan pemanasan dan dijaga agar pewarna tidak

menguap atau mendidih. Dibilas dengan menggunakan akuades. Selanjutnya ditetesi safranin selama 30 detik dan dibilas kembali menggunakan akuades dan dikeringkan dengan menggunakan *tissue*. Ditetesi minyak emersi dan dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 40x10 (Sunatmo, 2007).

Uji pergerakan bakteri atau motilitas dilakukan dengan cara mengambil isolat bakteri menggunakan jarum inokulasi yang lurus bagian ujungnya. Selanjutnya isolat bakteri ditusukkan ke dalam media *Sulfid Indol Motility* (SIM). Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bila pertumbuhan jauh menyebar dari daerah bekas tusukan pada media, artinya pergerakan positif (Fardiaz, 1992).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sebanyak 6 isolat berhasil diisolasi dari sampel ikan kembung (*Rastrelliger* sp.) asin berkitosan. Keenam isolat tersebut menunjukkan karakterisasi morfologi koloni dan sel yang berbeda-beda. Jumlah isolat yang diperoleh tidak berbeda jauh dengan hasil penelitian-penelitian sebelumnya.

Pada Tabel 1 dapat dilihat adanya tiga koloni isolat (50%) dengan bentuk bundar dan yang tidak beraturan, sebanyak tiga isolat (50%) koloni dengan tepian licin, dan sebanyak dua isolat (33,3%) dengan tepian berombak dan satu isolat (16,7%) dengan tepian yang tidak beraturan. Dua koloni isolat (33,3%) dengan elevasi cembung, diikuti dengan satu koloni isolat (16,7%) dengan elevasi koloni timbul dan elevasi datar. Sebanyak empat isolat (66,7%) dengan warna kuning dan sebanyak dua isolat (33,3%) dengan warna krem. Koloni bakteri yang memiliki warna kuning diduga memiliki pigmen karatenoid. Sedangkan koloni bakteri yang memiliki warna krem diduga bahwa koloni tersebut tidak mempunyai pigmen. Menurut Sudarsono (2008), warna pada koloni bakteri disebabkan karena adanya pigmen yang dihasilkan oleh bakteri. Pigmen karatenoid salah satunya akan memberikan warna kuning (Sudarsono, 2008).

Tabel 1. Karakterisasi morfologi koloni bakteri

No	Kode isolat	Morfologi Koloni dan Sel Bakteri		
		Bentuk	Elevasi	Tepian
1	IAK 01	Bundar	Cembung	Licin
2	IAK 02	Bundar	Cembung	Licin
3	IAK 03	Bundar	Timbul	Licin
4	IAK 04	Tidak beraturan	Timbul	Berombak
5	IAK 05	Tidak beraturan	Datar	Tidak beraturan
6	IAK 06	Tidak beraturan	Datar	Berombak

Tabel 2 menunjukkan bahwa dari enam isolat yang diperoleh, empat isolat diantaranya (66,7%) bersifat gram positif; dua isolat (33,3%) termasuk bakteri gram negatif Sunatmo (2007); Madigan *et al.* (2011); dan Hadioetomo (1993) menyatakan bahwa perbedaan reaksi pewarnaan Gram berdasarkan komposisi dinding sel bakteri. Dinding sel bakteri gram negatif terdiri dari 5-20% peptidoglikan, selebihnya adalah polisakarida, sedangkan dinding sel bakteri gram positif mengandung 90% peptidoglikan selebihnya adalah asam teikoat. Sel bakteri gram positif terlihat berwarna ungu karena dapat membentuk ikatan kompleks dengan pewarna pertama yaitu kompleks ungu kristal-iodium. Pada sel bakteri gram negatif pemberian larutan alkohol 95% dapat meningkatkan porositas dinding sel dengan melarutkan lipid pada membran luar sehingga kompleks ungu kristal-iodium akan terlepas dan sel menjadi tidak berwarna. Selanjutnya sel akan berwarna merah karena terwarnai oleh warna pembanding yaitu safranin.

Pada Tabel 2 juga dapat dilihat adanya empat isolat (66,7%) yang tidak berspora. Hal ini kemungkinan disebabkan karena sel vegetatif bakteri tersebut masih berumur sangat muda dan sel vegetatif belum melepaskan endospora menjadi spora bebas. Sedangkan sebanyak dua isolat (33,3%) yang berspora. Spora bakteri adalah bentuk bakteri dalam mempertahankan diri dari pengaruh lingkungan luar. (Fardiaz, 1992), jika sel semakin tua maka sel vegetatif akan pecah sehingga endospora akan terlepas menjadi spora bebas. Spora akan lebih tahan lama dalam keadaan yang ekstrim, misalnya dalam keadaan kering, panas atau adanya bahan kimia yang beracun. Menurut

Hadioetomo (1993), spora juga tahan terhadap pewarnaan. Spora yang telah berhasil diwarnai akan sulit melepaskan zat warna yang telah diserap sehingga tidak dapat mengikat zat warna yang diberikan berikutnya. Hal ini disebabkan karena spora memiliki selubung yang keras dan tebal. (Sunatmo, 2007). Zat warna yang digunakan dalam pewarnaan spora adalah *malachite green* yang akan tetap diikat oleh spora bakteri setelah pencucian dengan larutan safranin. Spora yang bebas akan berwarna hijau-biru dan sel vegetatif akan berwarna merah.

Tabel 2. Morfologi sel bakteri

No	Kode isolat	Morfologi Koloni dan Sel Bakteri			
		Gram	Bentuk	Spora	Moti Litas
1	IAK 01	Negatif	Kokus	Ber spora	Non Motil
2	IAK 02	Positif	Kokus	Tidak ber spora	Motil
3	IAK 03	Negatif	Kokus	Tidak ber spora	Motil
4	IAK 04	Positif	Kokus	Tidak ber spora	Non Motil
5	IAK 05	Positif	Kokus	Tidak ber spora	Motil
6	IAK 06	Positif	Kokus	Ber spora	Motil

Keterangan :

- IAK : Ikan Asin Kitosan
- 01, 02, 03,.....,06 : sistematika penomoran

Hasil pengamatan lanjutan dengan uji motilitas dapat dilihat pada Tabel 4.2. Sebanyak empat isolat (66,7%) bersifat motil. Hal ini ditunjukkan dengan adanya penyebaran bakteri pada media. Bakteri yang bersifat motil disebabkan bakteri tersebut mempunyai flagella. Sedangkan sebanyak dua isolat (33,3%) yang bersifat non-motil. Hal ini disebabkan karena bakteri tersebut tidak memiliki flagella. Kebanyakan bentuk sel bakteri kokus memiliki flagella. Flagella merupakan salah satu struktur utama di luar sel bakteri yang berfungsi dalam pergerakan (motilitas) pada sel bakteri. Tetapi, menurut Ristiati (2000), tidak semua bakteri memiliki flagella. Banyak spesies *Bacillus* dan *Spirillum* memiliki flagella pada sel nya tetapi jarang dijumpai pada sel kokus

KESIMPULAN

Jumlah isolat yang diperoleh dari sampel ikan kembung (*Rastrelliger* sp.) asin berkitosan sebanyak 6 isolat dengan karakteristik yang berbeda-beda. Karakterisasi morfologi koloni menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Sebanyak tiga (50%) bentuk bundar; tiga isolat (50%) tepian licin; dua koloni isolat (33,3%) elevasi cembung; tiga isolat (50%) warna kuning. Karakterisasi morfologi sel yang diperoleh: empat isolat (66,7%) bersifat gram positif; empat isolat (66,7%) tidak berspora; dan empat isolat (66,7%) bersifat motil.

REFERENSI

- Afrianto E dan Liviawaty E.** 1989. *Pengawetan dan Pengolahan Ikan*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Fardiaz S.** 1992. *Mikrobiologi Pangan* 1. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Hadioetomo RS.** 1993. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Penerbit Gramedia, Jakarta.
- Heruwati ES.** 2002. Pengolahan Ikan Secara Tradisional : Prospek dan Peluang Pengembangan. *Jurnal Penelitian Perkembangan Pertanian*, 21(3).
- Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, and Clark D.** 2011. *Biology of Microorganisms* Thirteenth Edition. Pearson Education International. USA.
- Purwani E dan Muwakhidah.** 2008. Efek Berbagai Pengawet Alami Sebagai pengganti Formalin Terhadap Sifat Organoleptik dan Masa Simpan Daging dan Ikan. *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*. 9 (1): 1-14.
- Ristiati PN.** 2000. *Pengantar Mikrobiologi Umum*. Departemen Pendidikan Nasional.
- Savitri SDN.** 2006. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Halotoleran pada Peda Ikan Kembung (*Rastrelliger* sp.). *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sedjati S and Agustini WT.** 2007. The Effect of Chitosan Concentration and Storage Time and The Quality of Salted- Dried Anhovy (*Stolephorus heterolobus*). *Jurnal of Coastal Development*. 10 (2): 63-71.
- Suptijah P, Gushagia P, dan Sukarsa DR.** 2008. Kajian Efek Daya Hambat Kitosan Terhadap Kemunduran Mutu Fillet Ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus*) Pada Penyimpanan Suhu Ruang. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan*. XI (2): 89-100.
- Sudarsono A.** 2008. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri pada Ikan Laut dalam Spesies Ikan Gindara (*Lepidocibium flavobronneum*). *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Sunatmo TI.** 2007. *Eksperimen Mikrobiologi Dalam Laboratorium*. Penerbit Ardy Agency, Bogor.
- Wudianto, Mahiswara dan Anugrah PA.** 2004. *Memancing di Perairan Tawar dan di Laut*. Penebar Swadaya. Jakarta.